

161  
2ej.



Universidad Nacional Autónoma  
de México  
Facultad de Ciencias

COMPUESTOS FOTOSENSIBLES EN  
Tagetes filifolia Lag. (COMPOSITAE)  
Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE BACTERIAS

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**BIÓLOGO**  
PRESENTA:  
Isidro Ramos Calzada



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	Páginas
I. INTRODUCCION	1
I.1 Objetivos	2
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Poliacetilenos y sus derivados tiofénicos	4
II.2 Actividad fotodinámica de los poliacetilenos y sus derivados tiofénicos	6
II.3 Mecanismos de interacción de los poliacetilenos y sus derivados tiofénicos	7
III. POSICION TAXONOMICA Y DESCRIPCION MORFOLOGICA DE <u>Tagetes filifolia</u> Lag.	9
III.1 Posición taxonómica	9
III.2 Descripción morfológica	10
IV. MATERIAL Y METODO	11
IV.1 Preparación del material	11
- Colecta	11
- Secado y molienda	11
IV.2 Extracción	12
- Compuestos volátiles	12
- Compuestos fotosensibles	12

IV.3 Separación por cromatografía en columna de las fracciones fotosensibles	13
IV.4 Pruebas biológicas	14
V. RESULTADOS	17
VI. DISCUSION	21
VII. CONCLUSIONES	23
VIII. APENDICE DE TABLAS	24
IX. APENDICE DE FIGURAS	32
X. BIBLIOGRAFIA	40

## INTRODUCCION

Las plantas constituyen una fuente natural de sustancias químicas que el hombre, desde siempre, ha aprovechado.

Una de las familias más interesantes y numerosas es la de las Compuestas. Debido a la gran cantidad de géneros y especies que comprende esta familia, es natural encontrar en ella un cúmulo de diversos compuestos de interés biológico, médico y químico.

Dentro de la familia Compositae el género Tagetes es de importancia química por poseer gran variedad de compuestos, entre ellos los fotosensibles. Un fotosensibilizador se define como un compuesto químico que, mediante activación por radiación, causa que otro compuesto de un sistema reaccione (Turro y Lamola, citados en: Towers, 1980). El término fotosensibilización se refiere a la fotooxidación de una sustancia o sistema biológico (Nilsson et al.: Santa maria y Prino, citados en: Towers, 1980).

La acción fotodinámica es efectiva tanto en organismos unicelulares como en pluricelulares, y puede afectar destruyendo la membrana, provocando cambios citoplasmáticos o nucleares, o inactivando enzimas. Usualmente causa la muerte celular. Las moléculas blancas que son fotooxidadas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos (Towers, 1980).

Los efectos de los fotosensibilizadores llegan a ser variados, desde la reacción que produce el psoraleno cuando se aplica a la piel humana en presencia de luz ultravioleta de longitud de onda larga (320 - 370 nm) provocando daño -- (psoriasis) (Pathak y Kramer, citados en: Camm et al., ---- 1975), hasta la fototoxicidad hacia ciertos microorganismos, tales como Candida albicans (Daniels, 1965).

Los fotosensibilizadores en plantas incluyen psoralenos o furanocumarinas, las hipericinas, los poliacetilenos y sus derivados tiofénicos. Algunos de estos compuestos, -- como las furanocumarinas, se presentan en las familias Rutaceae, Leguminosae y Umbelliferae (Pathak et al., citado en: Camm et al., 1975), mientras que los poliacetilenos y sus -- derivados tiofénicos se han detectado en la familia Compositae.

## OBJETIVOS

El presente trabajo surgió de la inquietud por conocer los fotosensibilizadores presentes en Tagetes filifolia, -- por lo que el objetivo de este estudio fue, precisamente, -- la búsqueda, obtención y caracterización de estos compues--

tos, abarcando los siguientes puntos:

- Obtención de extractos de la raíz, tallo con hojas e inflorescencia, utilizando cloruro de metileno.
- Determinación de su actividad bacteriostática.
- Separación de la fracción fotosensible de estos extractos.
- Análisis de los compuestos que la forman.

## ANTECEDENTES

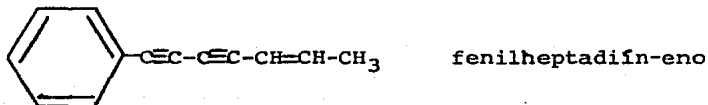
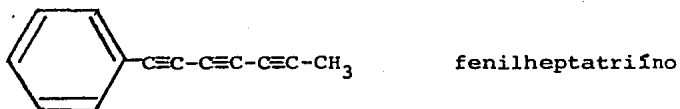
El género Tagetes ha sido objeto de diversas investigaciones, por lo que en la actualidad se sabe de la existencia de fotosensibilizadores en Tagetes erecta, T. minuta, T. patula (Chan et al., 1975) y T. tenuifolia (Baute, 1983). En estos estudios los compuestos fotosensibles encontrados han sido poliacetilenos y sus derivados tiofénicos.

## POLIACETILENOS Y SUS DERIVADOS TIOFENICOS

Los poliacetilenos son sustancias características de la familia Compositae, pero también presentes en otras familias de plantas con flores, así como en ciertos basidiomicetes (Bohlmann et al., citado en: Towers, 1980). Se les encuentra en todas las partes de la planta, aún en la cutícula de algunas especies (Towers y Wat, citados en: Towers, 1980).

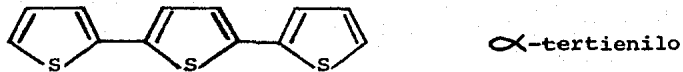
Frecuentemente, algunos poliacetilenos en particular se localizan en una región u órgano específico, aunque, como en el caso de la compuesta tropical Bidens pilosa, los poliacetilenos pueden encontrarse en toda la planta: el fenilheptatrieno en hojas, cutícula y tallo, mientras que el fenilheptadieno se restringe al tallo y raíces (Bohlmann et al.; Wat et al., citados en: Towers, 1980).

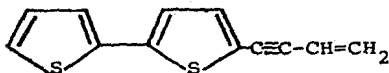




De los pétalos de Tagetes erecta se aisló un compuesto con fluorescencia azul intensa, que se identificó como  $\alpha$ -tertienilo (Zechmeister y Sease, citados en: Chan et al., 1975). Posteriormente se encontró que las raíces de Tagetes son una fuente importante de  $\alpha$ -tertienilo (Uhlenbroek y Bijloo, 1958, citados en: Chan et al., 1975).

En investigaciones posteriores se obtuvo un segundo compuesto aislado de las raíces de Tagetes, llamado 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo que, al igual que el  $\alpha$ -tertienilo presenta propiedades nematocidas (Uhlenbroek y Bijloo, 1959, citados en: Chan et al., 1975).





5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo

En los estudios en los que se obtuvieron los compuestos anteriormente mencionados, no se señala la especie de Tagetes de la cual fueron aislados, mientras que en un trabajo subsiguiente se reporta la obtención de  $\alpha$ -tertienilo y 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo a partir de la raíz de Tagetes patula (Chan et al., 1975).

En el análisis de Tagetes tenuifolia se encontró como componente principal de la raíz el  $\alpha$ -tertienilo. Dicho compuesto también se obtuvo en tallo e inflorescencia, además del bitienilo y poliacetilenos (Baute, 1983).

#### ACTIVIDAD FOTODINAMICA DE LOS POLIACETILENOS Y SUS DERIVADOS TIOFENICOS

Se ha señalado que el descubrimiento de propiedades antibióticas en plantas o en extractos de plantas ha llevado frecuentemente a la identificación de poliacetilenos como los compuestos responsables de esta actividad (Anchel, citado en: Towers, 1980).

El  $\alpha$ -tertienilo, presente en especies de Tagetes, es un compuesto fototóxico hacia varios organismos (Candida albicans, Bacillus subtilis, Escherichia coli) y provo-

ca fotodermatitis en la piel humana en presencia de luz ultravioleta (320 - 400 nm) (Arnason et al.; Towers et al.; Wat et al., citados en: Yamamoto et al., 1984).

La actividad fotodinámica de los poliacetilenos y sus derivados tiofénicos no se restringe al efecto anteriormente mencionado, ya que también se observó que mediante tratamientos leves con fenilheptatrieno y radiación ultravioleta, la respiración celular de Escherichia coli es inhibida rápidamente (Towers, citado en: Yamamoto et al., 1979). Otro efecto notable es la pérdida de  $K^+$  en eritrocitos humanos, seguida de una hemólisis, cuando son expuestos a algunos compuestos poliacetilénicos y luz ultravioleta (Wat et al., citado en: Yamamoto et al., 1979).

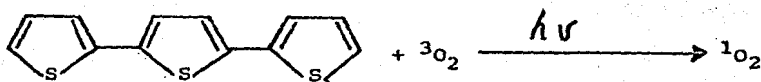
#### MECANISMOS DE INTERACCION DE LOS POLIACETILENOS Y SUS DERIVADOS TIOFENICOS

Se han realizado numerosos estudios sobre la importancia del  $O_2$  en la participación conjunta con poliacetilenos y sus derivados tiofénicos para la fotosensibilización de ciertos microorganismos, eritrocitos humanos y piel humana.

En uno de estos estudios se encontró que la fotosensibilización de E. coli por el  $\alpha$ -tertienilo ocurrió solamente bajo condiciones aerobias. Sin embargo, la fotosen-

sibilización de E. coli por el fenilheptatrieno ocurrió - tanto en condiciones aerobias como anaerobias (McLachlan et al., 1984).

Se ha comprobado que el  $\alpha$ -tertienilo actúa como un sensibilizador en la conversión de  $^3\text{O}_2$  a  $^1\text{O}_2$  (Bakker et al., 1979).



Al estudiar bajo microscopía electrónica eritrocitos humanos tratados con  $\alpha$ -tertienilo y radiación ultravioleta, se demostró que dicho compuesto actúa a nivel de membrana, ya que éstas fueron los blancos del  $^1\text{O}_2$  generado por el sensibilizador fotoactivado (MacRae et al., citado en: Downum et al., 1983). El  $\alpha$ -tertienilo actúa dañando las proteínas de la membrana (espectrinas) (Yamamoto et al., 1984).

En presencia de oxígeno el 5-(buten-1-inil)-2,2'-bietenilo (BBT) actúa de la misma manera que el  $\alpha$ -tertienilo, pero, probablemente debido a la presencia de una cadena lateral hidrocarbonada insaturada en el BBT, éste tiene acceso al interior celular (Downum et al., 1983).

POSICION TAXONOMICA Y DESCRIPCION MORFOLOGICA DE Tagetes  
filifolia Lag.

POSICION TAXONOMICA

DIVISION	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	ASTERIDAE
ORDEN	ASTERALES
FAMILIA	COMPOSITAE
TRIBU	HELENIAE
GENERO	<u>Tagetes</u>
ESPECIE	<u>Tagetes filifolia</u> Lag.

-----  
Sinonimia: Tagetes multifida DC.

Nombre común: Anisillo

## DESCRIPCION MORFOLOGICA

Tagetes filifolia Lag.

Planta anual, erecta, hasta de 45 cm de alto, con olor a anís al estrujarse; tallos generalmente muy ramificados, estriados, glabros o finamente puberulentos; hojas hasta de 3 cm de largo, pinnada o bipinnadamente divididas en segmentos linear-filiformes, éstos comunmente más de 7 por hoja, hasta de 12 mm de largo, glabros o puberulentos; cabezuelas con frecuencia numerosas, sobre pedúnculos de 5 a 20 mm de largo; involucreo fusiforme o a veces cilíndrico, de 6 a 9 mm de largo, sus brácteas 5, con el ápice truncado y apiculado; flores liguladas 0 a 3, generalmente blancas, sus láminas elípticas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 5 a 25, sus corolas amarillas, de 3 a 4 mm de largo, glabras; aquenios lineares, de 3 a 6 mm de largo, estriados, negruzcos, algo pubescentes, vilano de 2 escamas aristiformes, de 3 a 4 mm de largo y 2 o 3 escamas romas, de 0.5 a 2 mm de largo.

Su distribución es aparentemente escasa en el Valle de México, Tlalpan, Xochimilco y Tlalmanalco. Se encuentra de Baja California y Sonora a San Luis Potosí y hacia el sur - hasta el norte de Argentina, a una altitud de 2300 m y en lugares de suelo húmedo y orillas de campos cultivados (Rzedowski, 1985).

## MATERIAL Y METODO

### 1. Preparación del material

#### - Colecta

Tagetes filifolia se colectó en el municipio de Songo-lica, estado de Veracruz, en el mes de octubre de 1985. Su determinación se efectuó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU), en donde quedó el ejemplar de herbario, y se cotejó, además, en el Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias.

Debido a que los compuestos de interés son fotosensibles, el material colectado se protegió de la luz colocándolo en bolsas oscuras.

#### - Secado y molienda

La planta se secó a temperatura ambiente, separando -- previamente un lote de 62 gramos de planta fresca sin raíz, para la extracción de los compuestos volátiles. Una vez seca, se hizo la separación de las partes de la planta para formar tres grupos de la siguiente manera:

1. inflorescencia
2. tallo con hojas
3. raíz

Cada grupo se colocó independientemente en bolsas de plástico oscuras.

En un molino manual se molió dos veces cada grupo y se colocaron nuevamente en bolsas de plástico oscuras.

## 2. Extracción

### - Compuestos volátiles

Los 62 gramos de planta fresca sin raíz, separados antes del secado, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1 litro, al cual se le agregó éter en cantidad suficiente para cubrir el material, cerrando el recipiente con un tapón de hule forrado con papel aluminio.

Transcurridas 48 horas, el contenido del matraz se filtró, para obtener de esta manera la primera extracción etérea. Siguiendo el procedimiento anterior, se obtuvo la segunda extracción etérea con el mismo material que se empleó en la primera. Ambas extracciones se reunieron, se secó el éter con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó para obtener el extracto crudo seco; de éste se tomaron 65.5 mg para su análisis por cromatografía de gases en un aparato Varian 2000 con una columna de Chromosorb G 80/100 M-3% de OB 101 de 2 m x 3 mm.

### - Compuestos fotosensibles

Una vez molidos, se colocó cada grupo, previamente pesado, como lo indica la tabla 1, en un matraz de fondo redondo de 5 litros y a cada uno de los matraces se le adicio



no cloruro de metileno en la cantidad necesaria para cubrir el volumen que ocupaba el material (1 litro para inflorescencia, 2 litros para tallo con hojas y 1.5 litros para raíz). Cada matraz se cerró con un tapón de hule forrado con papel aluminio y se colocó al abrigo de la luz.

Transcurridos siete días, tiempo en el que el cloruro de metileno extrajo los compuestos de la planta, las soluciones se filtraron. Los filtrados se guardaron en frascos de vidrio ámbar de 4 litros de capacidad. Al residuo de este primer filtrado se le agregó la misma cantidad de cloruro de metileno que se adicionó al principio. Nuevamente se dejaron transcurrir siete días para obtener el segundo filtrado.

Una vez obtenidos los dos filtrados, éstos se reunieron y se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener los extractos crudos secos, con los rendimientos indicados en la tabla 2.

### 3. Separación por cromatografía en columna de las fracciones fotosensibles.

Con cada uno de los extractos crudos secos se efectuó una cromatografía en columna. Se empleó gel de sílice (Merck, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm) como adsorbente, en proporción 1:80, utilizando las siguientes cantidades:

inflorescencia:            2 g de extracto  
tallo con hojas:           3 g de extracto  
raíz:                        3 g de extracto

Se utilizó primeramente hexano como eluyente y posteriormente, se aumentó la polaridad a hexano - acetato de etilo 95:5 para terminar la columna de inflorescencia y 90:10 para terminar las de tallo y raíz. Para las tres columnas se colectaron fracciones de 50 ml (123 fracciones en inflorescencia, 174 en tallo y 207 en raíz).

Para conocer las fracciones fotosensibles, se empleó luz ultravioleta, ya que éstas son fluorescentes, y se agruparon según el color de su fluorescencia (tablas 5, 6 y 7).

El disolvente de las fracciones fluorescentes se eliminó a presión reducida y, finalmente, dichas fracciones fueron sometidas a una cromatografía líquido - líquido de alta resolución, en un aparato Varian 8500, con una columna Si-10 de 50 cm x 8 mm, para aislar los compuestos fotosensibles y analizarlos posteriormente por espectrometría en el ultravioleta (U.V.), en el infrarrojo (I.R.) y de masas (E.M.).

#### 4. Pruebas biológicas

Para la realización de estas pruebas se utilizaron Escherichia coli (Gram -; cepa pBR 327 RR1 procedente del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigacio

nes Biomédicas de la UNAM) y Bacillus subtilis (Gram +; cepa ATCC 6051 procedente del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNAM).

El crecimiento de los microorganismos se llevó a cabo por siembra de los inóculos en caldo simple.

Para las pruebas, se preparó el medio de cultivo con 38 g de agar Müller-Hinton (Bioxon) en 1 litro de agua destilada. Tanto el medio de cultivo, como todo el material utilizado fueron sometidos a esterilización en autoclave a 120°C y 15 lbs. de presión durante 15 minutos.

Todo el procedimiento posterior se llevó a cabo dentro de una campana estéril. Una vez frío el medio de cultivo, éste se vertió en 24 cajas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro, para cada concentración (4, 6 y 8 mg/ml) en cada uno de los tres extractos ensayados (9 lotes de 24 cajas). Al solidificarse el medio de cultivo se procedió a sembrar las bacterias con isopos estériles, previamente humedecidos en el caldo de cultivo. La siembra se realizó aplicando líneas horizontales y verticales continuas y cerradas en toda la superficie de la caja, con el objeto de obtener un crecimiento uniforme y compacto. Del total de las cajas de cada lote, en 12 se sembró Bacillus subtilis y en 12 Escherichia coli.

Posteriormente, en el centro de las cajas se agregaron, con ayuda de una pipeta Pasteur adelgazada de la pun-

ta, tres gotas del extracto hexánico de inflorescencia en tres lotes, uno para cada una de las tres concentraciones empleadas (4, 6 y 8 mg/ml, determinadas mediante pruebas preliminares de actividad). En igual forma se aplicaron los extractos hexánicos de tallo y de raíz. Cada uno de los extractos, en sus tres lotes, se agregó a 8 cajas, tanto para B. subtilis como para E. coli. El control para cada extracto, en cada una de sus concentraciones, constó de 8 cajas, 4 para B. subtilis y 4 para E. coli, a las cuales únicamente se les agregaron tres gotas de hexano (tabla 3).

Con el propósito de determinar la actividad fototóxica de los extractos, 6 de las 12 cajas por lote de B. subtilis se cubrieron con papel aluminio para protegerlas de la radiación ultravioleta, mientras que las cajas restantes se dejaron expuestas a la radiación. Este mismo procedimiento se siguió para E. coli.

Todas las cajas se colocaron en una campana bajo radiación ultravioleta de onda larga durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se suspendió la radiación, observándose los efectos. La metodología anterior se resume en la tabla 3 y los resultados en la tabla 4.

## RESULTADOS

### - Extractos

#### a) Compuestos volátiles

El extracto etéreo, conteniendo los compuestos responsables del olor de la planta y obtenido con un rendimiento de 2.60 g (4.19%), se analizó por cromatografía de gases, pudiendo separarse 13 componentes que se reportan en la tabla 8, con sus respectivos tiempos de retención.

#### b) Compuestos fotosensibles

Los extractos obtenidos de las tres partes de la planta tuvieron rendimientos diferentes (tabla 2), siendo el más abundante el de la inflorescencia, 4.46%. De la raíz se obtuvo 1.1% de extracto y del tallo, 0.8%. Estos rendimientos se calcularon referidos al peso seco de la parte correspondiente de la planta.

### - Fracciones fluorescentes

Respecto a la fracción fluorescente de cada una de las partes, la de raíz correspondió a un 22.16% del extracto crudo, la de tallo, a un 11.47% y la de inflorescencia, a un 17.45% (tablas 5, 6 y 7).

La separación de compuestos de estas fracciones fluorescentes por cromatografía de alta resolución, y el análisis espectrométrico de éstos, dieron los siguientes resultados:

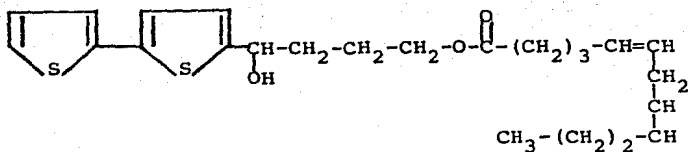
### 1. Raíz

Las fracciones fluorescentes obtenidas de la cromatografía en columna se agruparon en dos: I (f: 59-70) y ---- II (f: 149-162) (tabla 5).

Los cromatogramas obtenidos de la cromatografía líquido-líquido de alta resolución de estas dos fracciones indican la presencia de acetilenos en pequeña cantidad y tiofenos como sustancias predominantes (figuras 1 y 2).

De la fracción I de la cromatografía en columna se separó una sola fracción en la cromatografía de alta resolución, mientras que de la fracción II se separaron dos fracciones (1 y 2). La fracción I-1 fue idéntica a II-1 según lo demuestran sus espectros U.V., I.R., y E.M.

El análisis de estos espectros (U.V.: máx. 321 y 201; 400 y 230 nm (figura 5), I.R.:  $3448\text{ cm}^{-1}$  -OH;  $1728\text{ cm}^{-1}$   $\text{>C=O}$  (figura 5') y E.M.:  $M^+ - 18 = 414$ ) indica que se trata de un bitienilo esterificado con un ácido graso y se propone la siguiente fórmula tentativa:



La fracción II-2 es muy semejante, difiere en el ión molecular del E.M. ( $M^+ - 36 = 412$ ), por lo que se supone que es el mismo producto, pero dihidroxilado.

## 2. Tallo

De las tres fracciones fluorescentes obtenidas de la cromatografía en columna (tabla 6), se analizó la fracción III, la más abundante. Las otras fracciones (I y II) no tuvieron compuestos fotosensibles.

Del cromatograma obtenido de la fracción III se obtuvieron cuatro fracciones (figura 3), cuyos espectros en el U.V. e I.R. muestran que son poliacetilenos esterificados, probablemente también con un ácido graso.

El poliacetileno de la fracción III-1 (figura 6) tiene exclusivamente triples enlaces. El de la fracción III-2 (figura 7) tiene dobles y triples enlaces. Las fracciones III-3 y III-4 tienen espectros en el U.V. casi idénticos a la fracción III-2 por lo que se piensa son isómeros de un doble enlace.

## 3. Inflorescencia

Del extracto crudo de esta parte de la planta se separaron por cromatografía en columna cinco fracciones fluorescentes (tabla 7) de las cuales se analizó exclusivamente la fracción IV.

De esta fracción IV se separaron dos fracciones (1 y 2) por cromatografía de alta resolución (figura 4).

Los espectros de U.V. e I.R. de estas dos fracciones - (1 y 2) indican que se trata de compuestos similares a los bitienilos aislados de raíz.

- Pruebas biológicas

La actividad antibacteriana de los extractos crudos se presentó sólo frente a Bacillus subtilis y fue proporcional a las concentraciones empleadas.

El extracto de raíz resultó ser el más activo ya que - tuvo efecto en las tres concentraciones probadas, en seguida el de tallo (efecto a partir de la concentración de ---- 6 mg/ml) y, finalmente, el de flor, del que se requirió una mayor concentración (8 mg/ml) para observar un halo de inhibición menos marcado que los otros dos extractos, aunque -- permanente por más tiempo (tabla 4).



## DISCUSION

Siendo el objetivo principal de este trabajo la búsqueda de compuestos fotosensibles, se procedió en primer término a efectuar la prueba bacteriológica con los extractos -- crudos de las tres partes de la planta analizada.

El ensayo biológico se efectuó con Bacillus subtilis, (Gram +) y con Escherichia coli, (Gram -). Se sabe que los compuestos fotosensibles que se han encontrado en otras especies de Tagetes son activos frente a bacterias Gram +, pero frente a las Gram - casi no presentan actividad (Towers et al., 1977). Los extractos de Tagetes filifolia no presentaron actividad frente a Escherichia coli, pero sí frente a Bacillus subtilis, lo que indicó que había compuestos fotoactivos en dichos extractos.

Una vez establecida la presencia de estos compuestos - en los extractos, se procedió a separar la fracción foto -- sensible y a analizar su composición.

El análisis cromatográfico de alta resolución indicó - que los compuestos fotoactivos no se encuentran igualmente distribuidos en las tres partes de la planta analizada.

La raíz tiene muy poca cantidad de poliacetilenos y -- predominan los derivados tiofénicos. En el tallo hay casi exclusivamente poliacetilenos y en la inflorescencia, derivados tiofénicos.

La raíz es un posible centro importante de almacenamiento de compuestos fotosensibles ya que en ella se encuentran protegidos del efecto luminoso y pueden concentrarse en forma inactiva en mayor cantidad que en áreas o zonas iluminadas donde se podrían estar utilizando en su forma activa -- (Kauli et al., 1983).

El orden de actividad esperado en los extractos, de acuerdo con la distancia a la fuente de almacenamiento (raíz) sería: extracto de raíz como el de mayor actividad -- seguido en orden decreciente por tallo y flor.

El resultado de la prueba bacteriológica confirmó este orden, como se observa en la tabla 4.

Respecto a los compuestos encontrados en las fracciones fotosensibles, hasta ahora no se habían presentado bitienilos ni poliacetilenos esterificados con ácidos grasos en -- otras especies de Tagetes (Chan et al., 1975; Baute, 1983), lo cual es interesante pues podría ser una característica -- de la especie.

Como la planta presenta un olor a anís, muy agradable, se determinó la composición del extracto etéreo que contenía la fracción con los compuestos volátiles, la mayoría -- terpénicos, responsables del aroma. Esta fracción está -- constituida por una mezcla de 13 componentes principales, -- siendo los de mayor proporción el terpineol, el propionato de cinamilo, el  $\beta$ -pineno y el canfeno, todas estas usutancias de olor agradable (tabla 8),

**CONCLUSIONES**

1. Tagetes filifolia tiene compuestos fotoactivos, cuya --- mayor concentración se localiza en la raíz de la planta.
2. Estos compuestos son bitienilos y poliacetilenos esterificados probablemente con ácidos grasos.
3. los compuestos anteriormente mencionados son característicos, hasta ahora, sólo de esta especie!

TABLA 1

PESO DE LAS PARTES MOLIDAS DE Tagetes filifolia

Parte de la planta	Peso (g)
Inflorescencia	210
Tallo con hojas	700
Raíz	405

TABLA 2

RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES CON  
CLORURO DE METILENO

Parte de la planta	Rendimiento (g)	Porcentaje calculado sobre peso seco de la parte correspondien- te de la planta (%)
Inflorescencia	9.3790	4.4662
Tallo con hojas	6.0454	0.8636
Raíz	4.4932	1.1094

TABLA 3

## METODOLOGIA DE PRUEBAS BIOLOGICAS

parte de la planta	<u>Bacillus subtilis</u>				<u>Escherichia coli</u>				total de cajas por concentraci6n
	cajas	cajas	control		cajas	cajas	control		
	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	
Inflorescencia	4	4	2	2	4	4	2	2	24
Tallo con hojas	4	4	2	2	4	4	2	2	24
Raíz	4	4	2	2	4	4	2	2	24

TABLA 4

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Bacillus subtilis

Concentración	Inflorescencia		Tallo		Raíz		Control	
	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV
4 mg/ml	0 <sup>a</sup>	0	0	0	++	+	0	0
6 mg/ml	0	0	++	0	+++	+	0	0
8 mg/ml	++	+	+++	0	++++ <sup>b</sup>	+	0	0

Escherichia coli

Concentración	Inflorescencia		Tallo		Raíz		Control	
	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV
4 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
6 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
8 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: a. 0 - actividad nula

b. ++++ - actividad máxima

TABLA 5

FRACCIONES FLUORESCENTES DE LA  
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA PARA RAIZ

Fracción fluorescente	Fracciones de la columna	Eluyente	Peso (mg)	Porcentaje calculado sobre la cantidad de extracto crudo cromatografiado (%)
I	59 a 70	Hexano-AcOET 95:5	426.5	14.22
II	149 a 162	Hexano-AcOET 90:10	238.1	7.94
				<hr/> Total 22.16



TABLA 6

FRACCIONES FLUORESCENTES DE LA  
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA PARA TALLO CON HOJAS

Fracción fluorescente	Fracciones de la columna	Eluyente	Peso (mg)	Porcentaje calculado sobre la cantidad de extracto crudo cromatografiado (%)
I	24 a 33	Hexano	10.8	0.36
II	49 a 78	Hexano	15.0	0.50
III	143 a 174	Hexano-AcOET 90:10	318.4	10.61
			<b>Total</b>	<b>11.47</b>

TABLA 7

FRACCIONES FLUORESCENTES DE LA  
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA PARA INFLORESCENCIA

Fracción fluorescente	Fracciones de la columna	Eluyente	Peso (mg)	Porcentaje calculado sobre la cantidad de extracto crudo cromatografiado (%)
I	28 a 65	Hexano	80.09	4.00
II	66 a 71	Hexano	55.58	2.78
III	72 a 86	Hexano-AcOET 95:5	47.78	2.39
IV	87 a 98	Hexano-AcOET 95:5	96.50	4.83
V	99 a 123	Hexano-AcOET 95:5	68.93	3.45
				Total 17.45

TABLA 8

COMPONENTES DEL EXTRACTO ETereo

Compuesto	Tiempo de retención (min)	%
propionato de cinamilo	3.44	2.7900
canfeno	4.51	1.9282
$\beta$ -pineno	5.48	2.1640
limoneno	7.30	0.5836
eucaliptol	8.07	0.3755
linalol	13.42	0.0441
dimicetal	14.55	0.1014
acetato de linalilo	16.76	0.4361
mentol	18.38	0.5897
isoeugenol	18.99	0.3623
terpineol	20.07	7.7338
$\alpha$ -octalactona	25.41	0.4169
nerolidol	28.11	0.3521

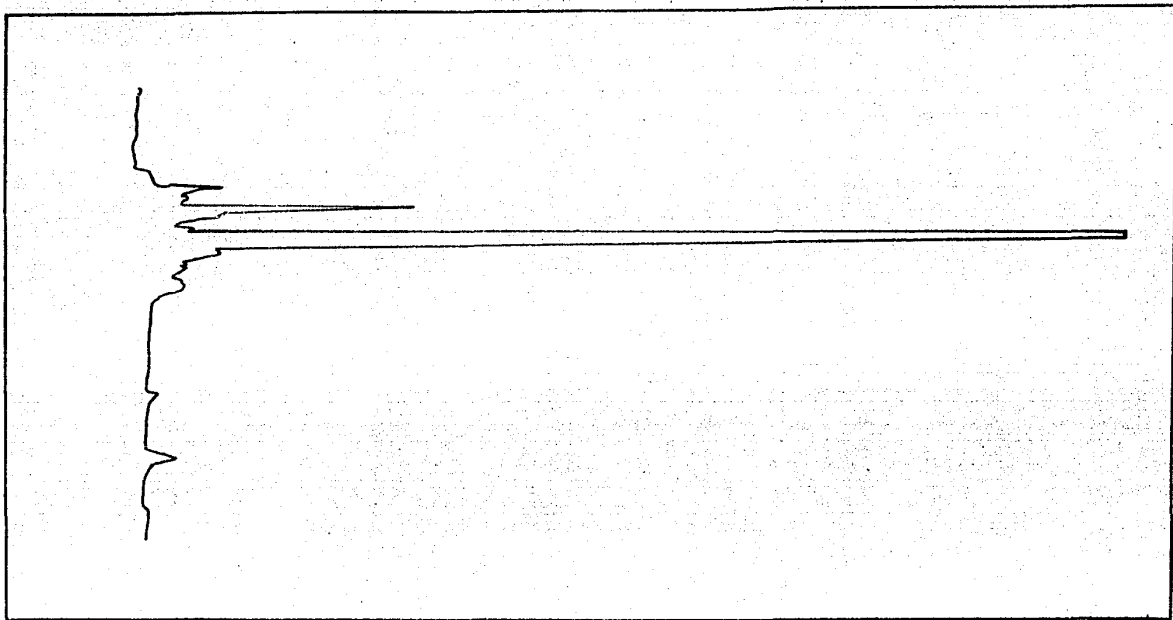


FIGURA 1

CROMATOGRAMA DE ALTA RESOLUCION DE LA FRACCION

FLUORESCENTE I DE RAIZ

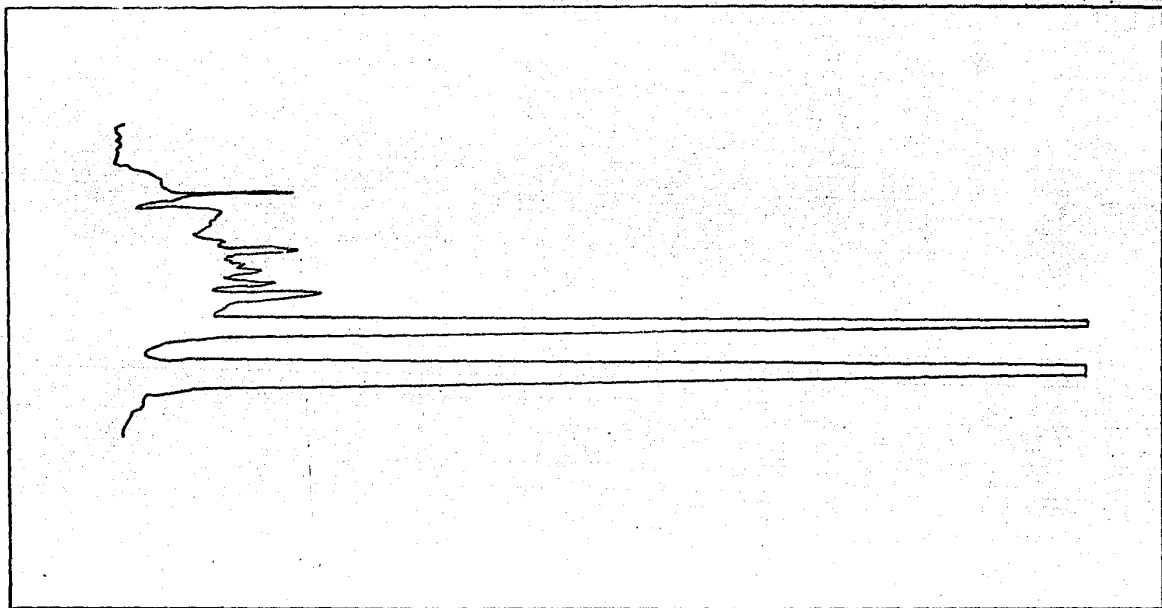


FIGURA 2  
CROMATOGRAMA DE ALTA RESOLUCION DE LA FRACCION  
FLUORESCENTE II DE RAIZ

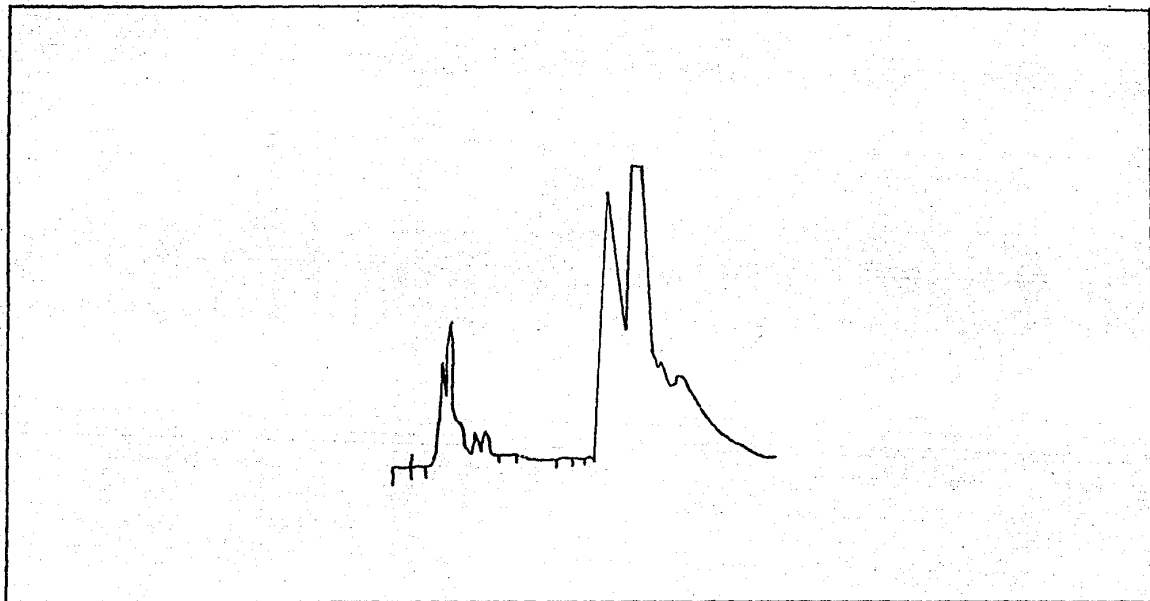


FIGURA 3  
CROMATOGRAMA DE ALTA RESOLUCION DE LA FRACCION  
FLUORESCENTE III DE TALLO

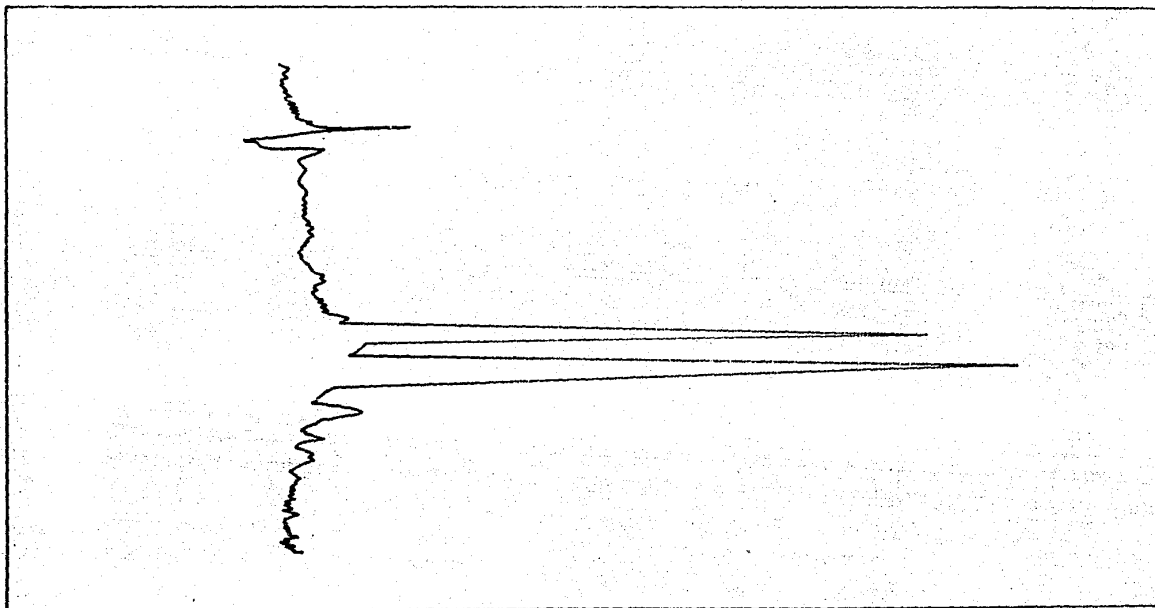


FIGURA 4  
CROMATOGRAMA DE ALTA RESOLUCION DE LA FRACCION FLUORESCENTE IV  
DE INFLORESCENCIA

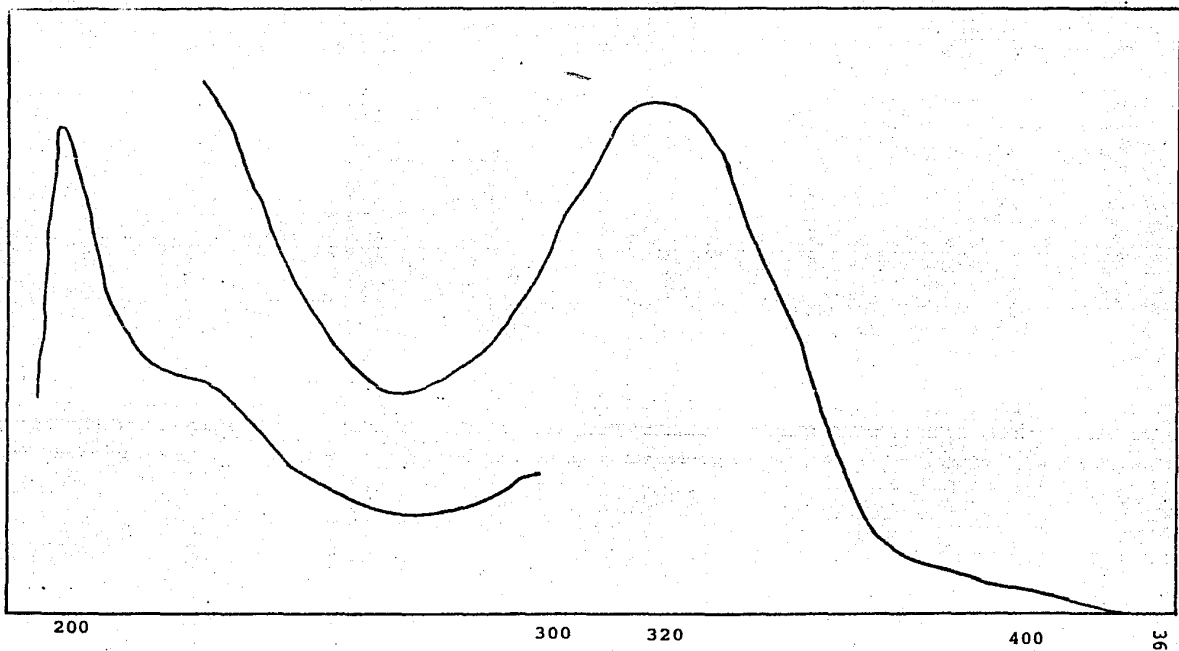


FIGURA 5  
ESPECTRO EN EL UV DE LA FRACCION FLUORESCENTE II-1 DE RAIZ



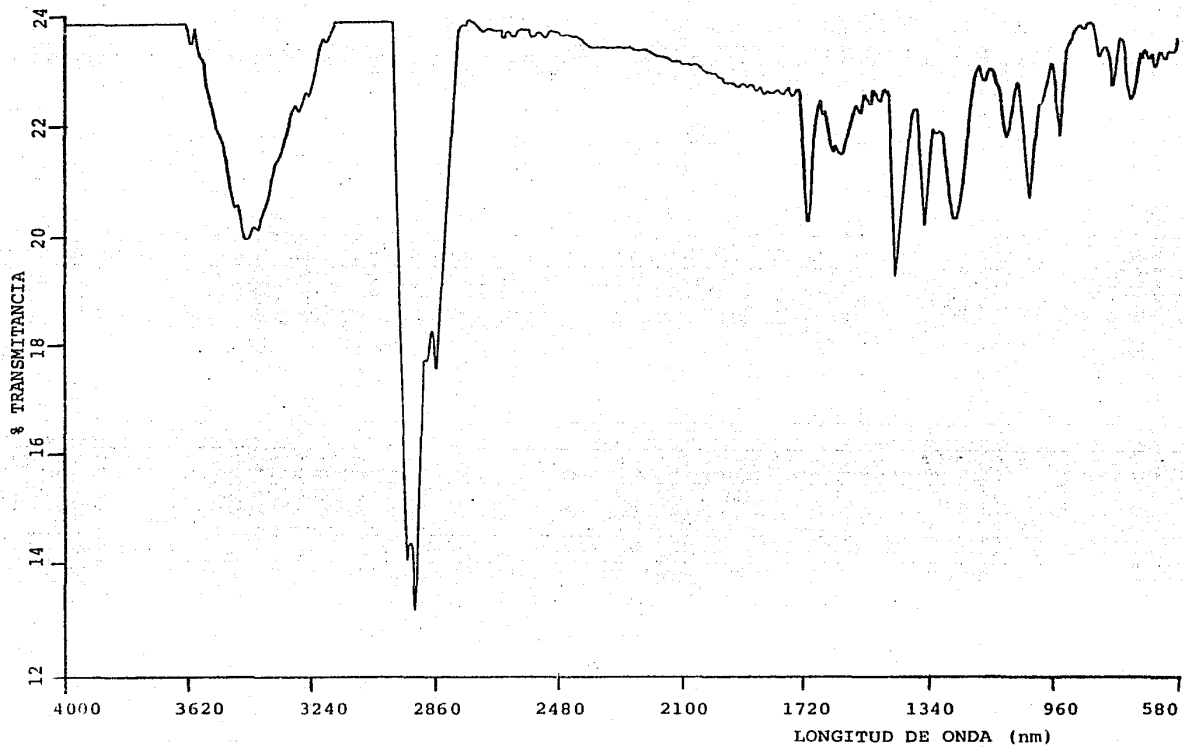
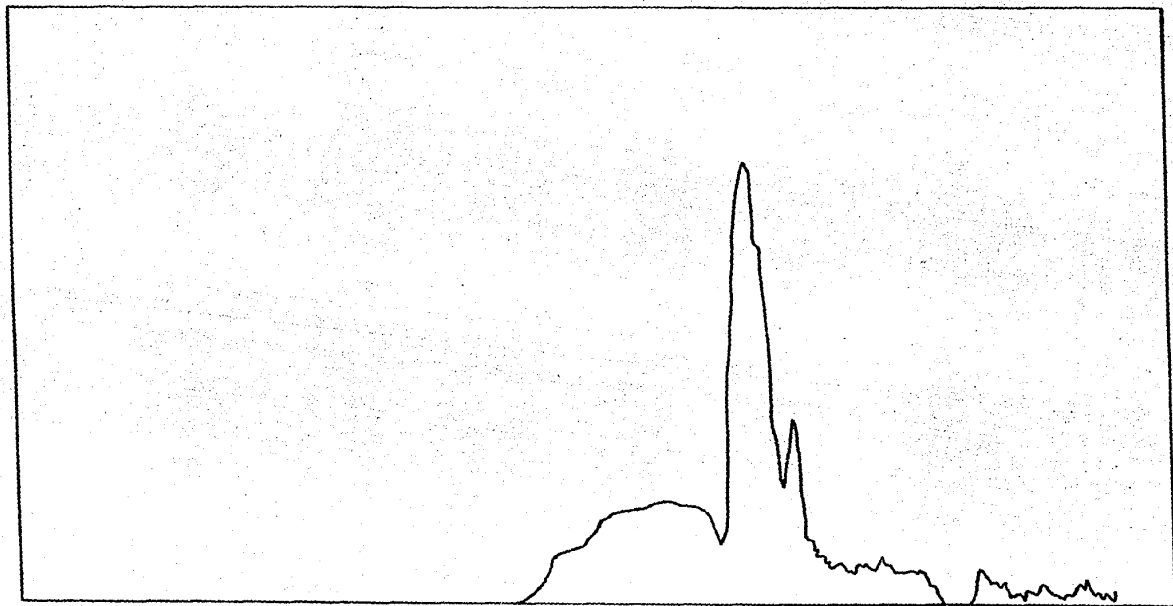


FIGURA 5'

ESPECTRO EN EL IR DE LA FRACCION FLUORESCENTE II-1 DE RAIZ



400

300

270 261

200

38

FIGURA 6

LONGITUD DE ONDA (nm)

ESPECTRO EN EL UV DE LA FRACCION FLUORESCENTE III-1 DE TALLO

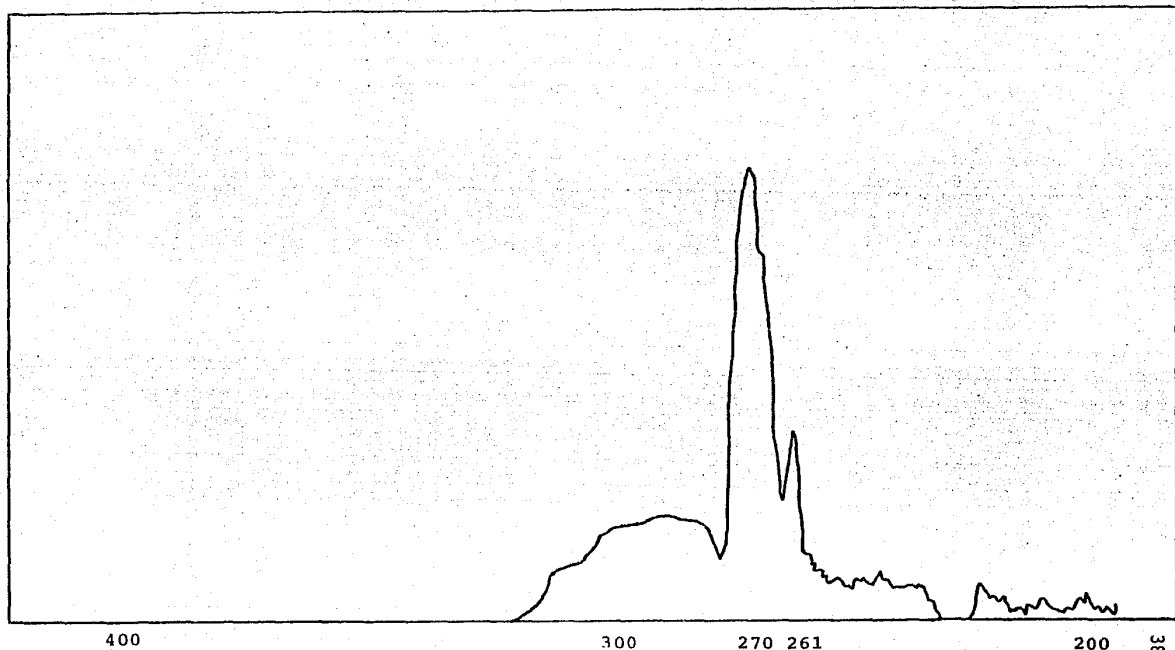
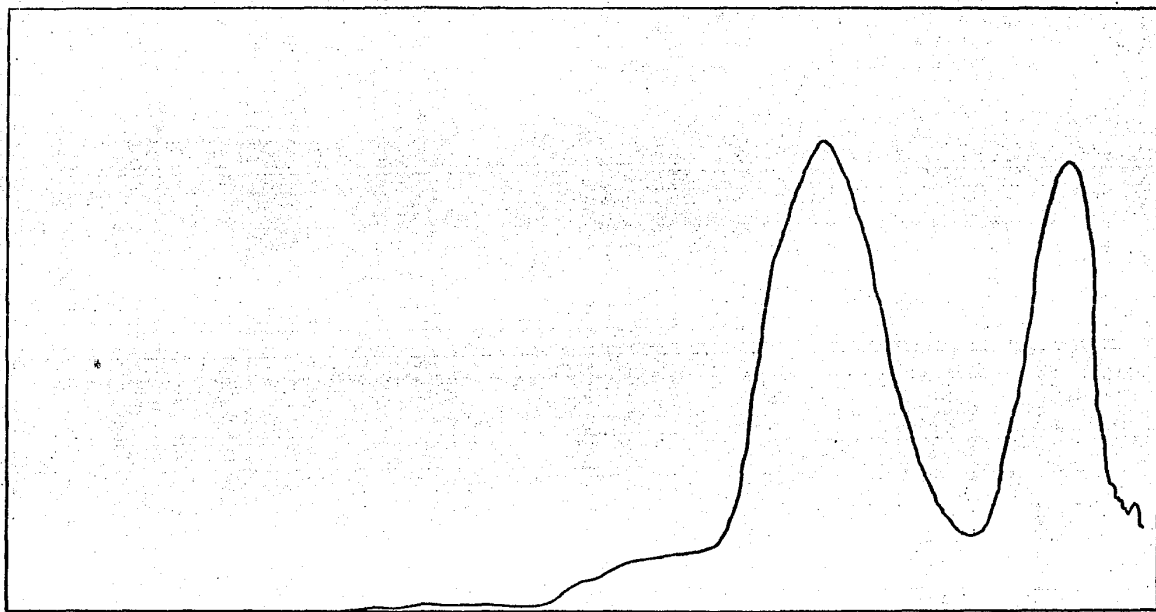


FIGURA 6  
ESPECTRO EN EL UV DE LA FRACCION FLUORESCENTE III-1 DE TALLO

LOANGITUD DE ONDA (nm)



400

300

260

228

209

200

FIGURA 7

LONGITUD DE ONDA (nm)

ESPECTRO EN EL UV DE LA FRACCION FLUORESCENTE III-2 DE TALLO

## BIBLIOGRAFIA

- Bakker, J., F. J. Gommers, I. Nieuwenhuis y H. Wynberg ---  
(1979) Photoactivation of the nematicidal compound --  
 $\alpha$ -terthienyl from roots of marigolds (Tagetes -----  
species). J. Biol. Chem. 254: 1841 - 1844.
- Baute, R. Y. (1983) Estudio Químico-Biológico de los Ex--  
tractos Hexánicos de Tagetes tenuifolia (Compositae).  
Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Camm, E. L., G. H. N. Towers y J. C. Mitchell (1975) -----  
UV-Mediated antibiotic activity of some Compositae ---  
species. Phytochemistry. 14: 2007 - 2011.
- Chan, G. F. Q., G. H. N. Towers y J. C. Mitchell (1975) --  
Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene  
compounds of Tagetes. Phytochemistry. 14: 2295 - 2296
- Daniels, F. (1965) A simple microbiological method for --  
demonstrating phototoxic compounds. J. Invest. Derm.  
44: 259 - 263.
- Downum, K. R., R. E. W. Hancock y G. H. N. Towers (1983) -  
Photodynamic action on Escherichia coli of natural ---

acetylenic thiophenes, particularly -----  
5-(buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl. Photochemistry and -  
Photobiophysics. 6: 145 - 152.

Kauli, G., et al. (1983) Extraction, separation, quanti--  
fication and evaluation of the phototoxic potency of -  
furocoumarins in different parts of Heracleum lacinia-  
tum. Photobiochemistry and Photobiophysics. 5: 159 --  
168.

McLachlan, D., T. Arnason y J. Lam (1984) The role of oxy--  
gen in photosensitizations with polyacetylenes and ---  
thiophene derivatives. Photochemistry and Photobiolo-  
gy. 39: 177 - 182.

Rzedowski, J., G. C. de Rzedowski (1985) Flora Fanerogá--  
mica del Valle de México. Volumen II Dicotyledoneae.  
ENCB-IPN e Instituto de Ecología. México, D. F. pp. --  
674.

Towers, G. H. N., C. K. Wat, E. A. Graham, R. J. Bandoni,  
G. F. Q. Chan, J. C. Mitchell y J. Lam (1977) Ultra--  
violet-mediated antibiotic activity of species of ----  
Compositae caused by polyacetylenic compounds. Lloydia  
40: 487 - 498.

Towers, G. H. N. (1980) Photosensitizers from Plants and their Photodynamic Action. Pergamon Press. 6: 183 -- 202.

Yamamoto, E., C. K. Wat, W. D. MacRae, G. H. N. Towers y C. F. Q. Chan (1979) Photoinactivation of human erythrocyte enzymes by  $\alpha$ -terthienyl and phenylhepta-----triyne, naturally occurring compounds in the Astera--ceae. Febs Letters. 107: 134 - 136.

Yamamoto, E., W. D. MacRae, F. J. Garcia y G. H. N. ----- Towers (1984) Photodynamic hemolysis caused by -----  $\alpha$ -terthienyl. Planta Medica. 124 - 127.